Physiol. Vég., 1981, **19** (3), 367-378

Microanalyse des granules vacuolaires des ectomycorhizes, endomycorhizes et endomycothalles

Désiré-Georges STRULLU *, Jean-Pierre GOURRET *
et Jean-Pierre GARREC **

* *Laboratoire de Botanique et Laboratoire de Biologie cellulaire, Université de Rennes, avenue du Général-Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France.*

** *Laboratoire de Biologie végétale, Département de Recherche fondamentale, Centre d'Études nucléaires de Grenoble, 85 X, 38041 Grenoble Cedex, France.*

(Manuscrit reçu le 13 février 1981, accepté le 24 avril 1981)

RÉSUMÉ

Mots clés : mycorhizes, microanalyse, vacuoles, polyphosphate, calcium.

Des granules vacuolaires sont mis en évidence dans trois associations symbiotiques : ectomycorhizes du *Pseudotsuga menziesii*, endomycorhizes à vésicules et arbuscules du *Trifolium pratense* et endomycothalles du *Pellia epiphylla*. La composition de ces granules vacuolaires est recherchée à l'aide de la microsonde électronique. Le phosphore et le calcium y sont détectés de façon constante. Les concentrations relatives des granules sont comparées à celles de différents organites cellulaires des symbiotes fongiques et des cellules-hôtes. La concentration en phosphore et en calcium de ces granules est toujours supérieure à celle de la partie claire de la vacuole. La concentration en phosphore des granules est également plus élevée que celle du cytoplasme. Les granules vacuolaires riches en phosphore et en calcium existent donc dans les principaux types de mycorhizes. Ceci souligne l'importance du compartiment vacuolaire fongique dans la physiologie des mycorhizes. Le rôle du calcium et d'autres cations dans le maintien de l'équilibre ionique des vacuoles est discuté à la lumière des acquisitions récentes sur la physiologie de cet organite.

SUMMARY

Key words: mycorrhizas, microanalysis, vacuole, polyphosphate, calcium.

Vacuolar granules are regularly present in three symbiotic associations: ectomycorrhizas of Pseudotsuga menziesii, *VA endomycorrhizas* of Trifolium pratense *and endomycothalli* of Pellia epiphylla. *The composition of these vacuolar granules was studied by electron probe microanalysis. Phosphorus and calcium were constantly detected in them. Their relative contents were compared with those of different cell organelles from the fungal symbiont and from host-cells. The concentrations of phosphorus and calcium in these granules were always higher than in the light part of the vacuole. The level of phosphorus in the granules was also superior to that of the cytoplasm. Thus vacuolar granules, rich in phosphorus and calcium, exist in the main types of mycorrhizas. This emphasizes the importance of the fungal vacuolar compartment in mycorrhizas physiology. The role of calcium and other cations in the ionic stabilization of vacuoles is discussed in connexion with recent discoveries on the physiology of the organelle.*

INTRODUCTION

Dans la symbiose, les mycorhizes réunissent les racines des Végétaux et les mycélium des Champignons. Sur des bases anatomiques et cytologiques, on distingue les ectomycorhizes des endomycorhizes (Boullard, 1968; Harley, 1969; Peyronel *et*

al., 1969; STRULLU, 1976). Les associations symbiotiques formées par des Champignons et des thalles de Bryophytes sont nommées mycothalles (MAGROU, 1925). Habituellement, ces mycothalles sont rattachés aux mycorhizes au sens large (BOULLARD, 1968).

Il est maintenant clairement démontré que les mycorhizes favorisent la nutrition phosphorée des Végétaux, mais on connaît peu les processus physiologiques conduisant à l'accumulation du phosphore dans les plantes hôtes (BOWEN, 1973; BOWEN *et al.*, 1975; HARLEY, 1978; TINKER, 1978). Récemment les méthodes cytochimiques ont permis de détecter dans les cellules des Champignons formant des mycorhizes des granules riches en phosphore. Dans le cas des ectomycorhizes, à partir d'observations effectuées chez le *Pinus brutia*, ces structures ont d'abord été nommées granules métachromatiques vacuolaires (STRULLU et GOURRET, 1973). En 1975, ASHFORD *et al.* ont décrit chez les ectomycorhizes de l'Eucalyptus des granules de polyphosphates. Ils ont ensuite été retrouvés chez le *Pseudotsuga* (STRULLU, 1976). Enfin, des granules comparables ont aussi été étudiés chez le Hêtre par CHILVERS et HARLEY (1980).

En ce qui concerne les endomycorhizes, LING LEE *et al.* (1975) ont observé des granules de polyphosphates dans le Champignon symbiotique du *Liquidambar*. Des structures analogues ont été décrites dans les endomycorhizes d'*Allium cepa* (COX *et al.*, 1975) et de *Taxus baccata* (STRULLU, 1976, 1978).

Dans les hyphes de *Glomus mosseae*, symbiotique du *Glycine max*, WHITE et BROWN (1979) ont noté la présence de trois types de granules. D'après l'analyse aux rayons X, l'un d'entre eux contient des concentrations élevées en phosphore et en calcium; ces structures sont comparables aux granules de polyphosphates. Chez le *Glomus mosseae* associé à l'Oignon, COX *et al.* (1980) ont trouvé que les granules de polyphosphates, d'une taille moyenne de 0,2 µm, occupent environ 0,8 % du volume fongique; les plus gros d'entre eux (0,7 µm) contiennent jusqu'à $3,6.10^{-15}$ g de phosphore.

STRULLU *et al.* (1981) ont montré que les hyphes du symbiote fongique des mycorhizes de *Taxus baccata* possèdent de nombreux granules métachromatiques vacuolaires. Ils sont visibles au cours de la phase de prolifération de l'arbuscule et disparaissent lors de la phase de destruction du Champignon. Des analyses à la microsonde électronique indiquent qu'ils sont riches en phosphore et en calcium. Le potassium et le magnésium sont également présents mais en faible quantité.

A l'heure actuelle, les auteurs semblent d'accord pour considérer que granules métachromatiques vacuolaires, granules de polyphosphates et granules riches en phosphore représentent des structures identiques (WHITE et BROWN, 1979; CHILVERS et HARLEY, 1980; STRULLU *et al.*, 1981). Cependant, ces structures n'ont encore été étudiées que dans un nombre limité de mycorhizes.

La présente note offre des résultats concernant la microanalyse des granules riches en phosphore de trois types très différents de mycorhizes naturelles : ectomycorhizes de *Pseudotsuga*; endomycorhizes à vésicules et arbuscules de *Trifolium*; mycothalles de *Pellia*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans un premier temps, les granules métachromatiques vacuolaires ont été recherchés de façon systématique chez des mycorhizes naturelles prélevées dans la région Ouest de la France. Dans un deuxième temps, pour la présente étude, le matériel suivant a été retenu : ectomycorhizes du *Pseudotsuga menziesii*

Mirb., endomycorhizes à vésicules et arbuscules de *Trifolium pratense* L., endomycothalles du *Pellia epiphylla* Corda. Le *Pseudotsuga mensiesii* et le *Trifolium pratense* proviennent du jardin botanique de l'Université de Rennes; le *Pellia epiphylla* a été récolté en forêt de Rennes.

Les fragments de racines sont fixés au glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2). Les pièces sont ensuite postfixées au tétroxyde d'osmium à 2 % dans le même tampon durant 1 à 2 h à 4°C. Après déshydratation par l'alcool, les échantillons sont inclus dans l'Epon. Pour mettre en évidence les granules, en microscopie photonique, des coupes de 1 µm environ sont colorées au bleu de toluidine à pH 3,5 (EBEL *et al.*, 1958). La cytologie ultrastructurale des mycorhizes retenues a été étudiée à partir de coupes ultrafines contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

Pour la microanalyse, des coupes de 1 300 Å environ ont été déposées sur des grilles de cuivre ou d'aluminium préalablement recouvertes de collodion. Ces préparations ont été étudiées à la microsonde Camebax fonctionnant selon le principe de la sonde de Castaing (THIBAUT *et al.*, 1977; PARIS *et al.*, 1978; DESPORTES *et al.*, 1978). Cette microsonde permet l'observation des échantillons en microscopie électronique à transmission et en microscopie électronique à balayage. L'appareil opère à 50 kV et à 120 nA. Le diamètre du faisceau est de 300 nm. Le rayonnement X émis par l'échantillon est analysé de deux façons : soit par dispersion d'énergie, le détecteur étant une diode silicium-lithium, soit par dispersion de longueur d'onde utilisant des cristaux. Pour cette étude, le cristal PET (pentaérythrytol) a été utilisé.

En microscopie électronique à transmission, les analyses ont été effectuées en des points sélectionnés des préparations. Les temps de comptage ont été fixés à 10 sec. En microscopie électronique à balayage, les analyses ont été faites sur les mêmes coupes de 1 300 Å. Les clichés obtenus superposent les images en électrons secondaires et la courbe des variations des concentrations en phosphore et en calcium le long d'une ligne droite matérialisant la traversée de la cellule étudiée.

RÉSULTATS

Ectomycorhizes du *Pseudotsuga menziesii*

Les ectomycorhizes naturelles du *Pseudotsuga* comprennent un manteau fongique épais et un réseau de Hartig unisérié bien développé. Le Champignon constituant ces ectomycorhizes naturelles n'a pas été isolé. Les granules vacuolaires existent à la fois dans le manteau fongique et dans le réseau de Hartig (*fig.* 1 A et B). Chaque section d'hyphe possède de 5 à 7 granules; une même vacuole peut contenir 2 à 3 granules. Une recherche systématique des principaux éléments communément répandus dans le matériel végétal a abouti à l'identification du phosphore et du calcium.

TABLEAU

Concentrations relatives en phosphore et en calcium
en quelques points caractéristiques des mycorhizes du *Pseudotsuga menziesii* (nombre de coups . s^{-1} . 10)

Relative levels of phosphorus and calcium
in some characteristic points of Pseudotsuga menziesii *mycorrhizas* (*counts . sec*$^{-1}$ × 10).

Territoire cellulaire	Phosphore			Calcium		
Granule	234	203	378	386	380	298
	677	207	228	754	92	215
	238	463	356	378	521	322
Vacuole claire	3	6	0	15	0	0
Cytoplasme du Champignon	53	57	86	82	144	116
Paroi du Champignon	15	1	29	462	302	659
Paroi de la cellule-hôte	25	26	11	611	797	532
Noyau de la cellule-hôte	140	54	172	482	210	350

Les résultats de la microanalyse présentés dans le tableau montrent que les concentrations en phosphore et en calcium enregistrées dans les granules sont très

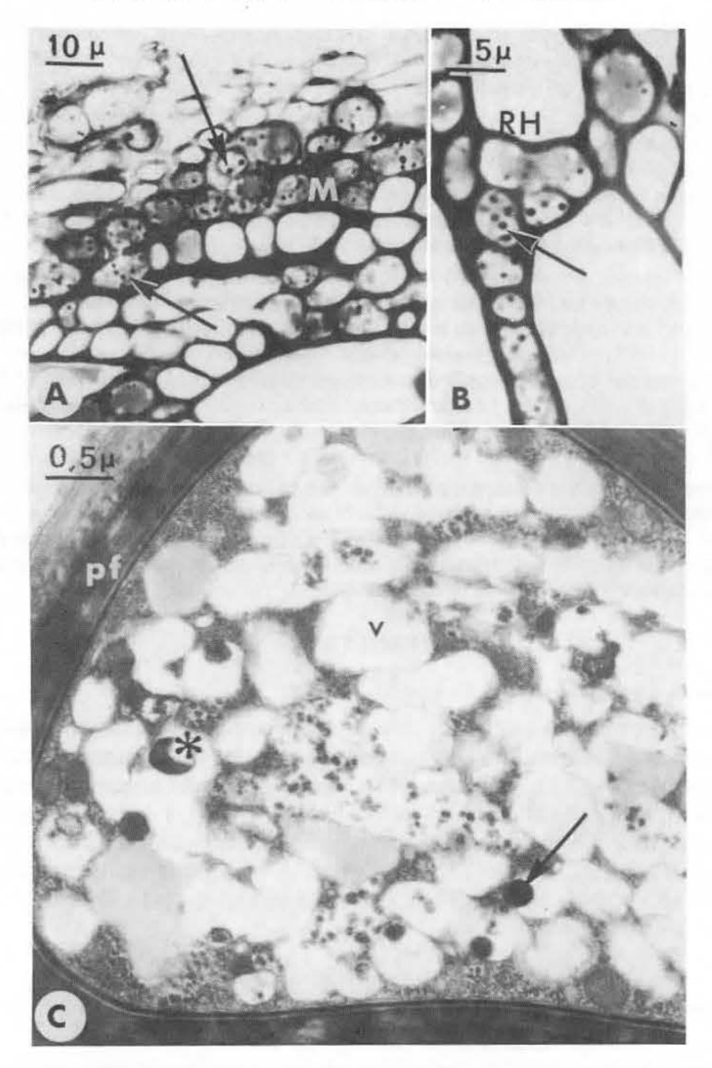


FIG. 1. A et B. – Microscopie photonique. Coupe semifine d'une ectomycorhize de *Pseudotsuga menziesii*. Coloration au bleu de toluidine. Noter la présence de 2 à 6 granules (flèches) par section d'hyphes, au niveau du manteau et du réseau de Hartig. M. manteau fongique; RH, réseau de Hartig. C. Microscopie électronique. Endomycorhize de *Trifolium pratense*. L'hyphe intercellulaire est limitée par une paroi épaisse (pf). Certaines vacuoles (v) contiennent un granule dense aux électrons (flèche). Noter aussi la présence d'un granule partiellement volatilisé sous le faisceau d'électrons (astérisque). En microscopie photonique et après coloration au bleu de toluidine à pH 3,5 ces granules vacuolaires sont métachromatiques.

– *Light microscopy. Semithin section of an ectomycorrhiza of* Pseudotsuga menziesii *stained with toluidine blue. Notice the presence of 2 to 6 granules per sectioned hyphae (arrows) in the mantle and Hartig net. M, fungal mantle; RH, Hartig net. C. Electron microscopy. Endomycorrhiza of* Trifolium pratense. *The intercellular hypha possesses a thick cell-wall (pf). Some vacuoles (v) contain an electron-dense granule (arrow). Also notice the presence of a granule partially volatilized under the electron beam (asterisk). In light microscopy and after staining with toluidine blue at pH 3,5 these vacuolar granules appear metachromatic.*

nettement supérieures à celles notées dans les vacuoles claires du Champignon. Les concentrations en phosphore et en calcium sont aussi nettement plus élevées dans ces granules que dans le cytoplasme fongique. Les granules contiennent plus de phosphore que les parois du Champignon ou des cellules-hôtes. Par contre, ils montrent une concentration en calcium équivalente à celle des parois. Les granules présentent des concentrations en phosphore et en calcium égales ou supérieures à celles des noyaux des cellules-hôtes.

Endomycorhizes de *Trifolium pratense*

Le Champignon formant les endomycorhizes du *Trifolium pratense* a été rattaché au *Glomus mosseae* en raison des caractères des spores et des hyphes intracellulaires. La souche est maintenue en culture. Ce Champignon appartenant aux Endogonacées forme des troncs et des vésicules intercellulaires. Dans les cellules-hôtes, il produit des vésicules et des arbuscules. Les éléments intracellulaires sont entourés par une paroi fongique, une couche d'isolement caractéristique et le plasmalemme de la cellule-hôte (Strullu et Gourret, 1980). Au niveau des troncs intercellulaires (*fig.* 1 C), l'épaisse paroi fongique est unie à la paroi de la cellule-hôte, mais la couche d'isolement n'est pas représentée. Les vacuoles fongiques montrent des granules denses aux électrons et métachromatiques en microscopie photonique par suite d'une coloration au bleu de toluidine. Ces granules qui mesurent de 0,1 à 0,3 µm occupent des vacuoles dont la taille est de l'ordre de 0,5 µm (*fig.* 1 C). Par rapport à l'endophyte du *Taxus baccata* (Strullu *et al.*, 1981), les granules de polyphosphates du *Glomus mosseae* sont donc en moyenne nettement plus petits et plus rares. De nombreuses vacuoles, pouvant atteindre 1 µm, apparaissent claires et dépourvues de granules dans le plan observé.

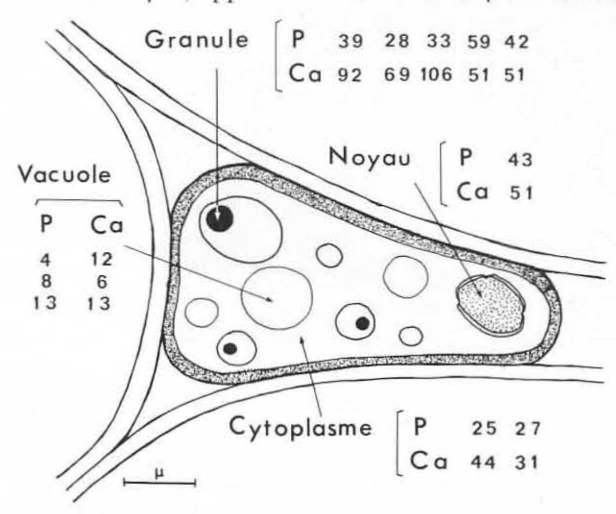


Fig. 2. – Schéma d'une hyphe intercellulaire d'endomycorhize de *Trifolium pratense* et teneurs relatives en phosphore et en calcium en différents points caractéristiques (coups . sec^{-1} . 10).

– *Schematic representation of an intercellular hypha of a* Trifolium pratense *endomycorrhiza showing the relative levels of phosphorus and calcium in some characteristic points* (*counts . sec^{-1}* × 10).

Les résultats concernant les analyses correspondantes sont présentés dans la figure 2. Ils démontrent que les granules métachromatiques vacuolaires du *Glomus mosseae*, symbiotique du Trèfle sont riches en phosphore et en calcium. Les concentrations en phosphore de ces granules sont environ 5 fois plus élevées que celles des vacuoles claires. Pour le calcium, les granules sont en moyenne 6 à 7 fois plus riches que les vacuoles. Les concentrations en phosphore et en calcium sont également plus élevées que dans le cytoplasme du Champignon; elles sont pratiquement équivalentes à celles détectées dans les noyaux fongiques.

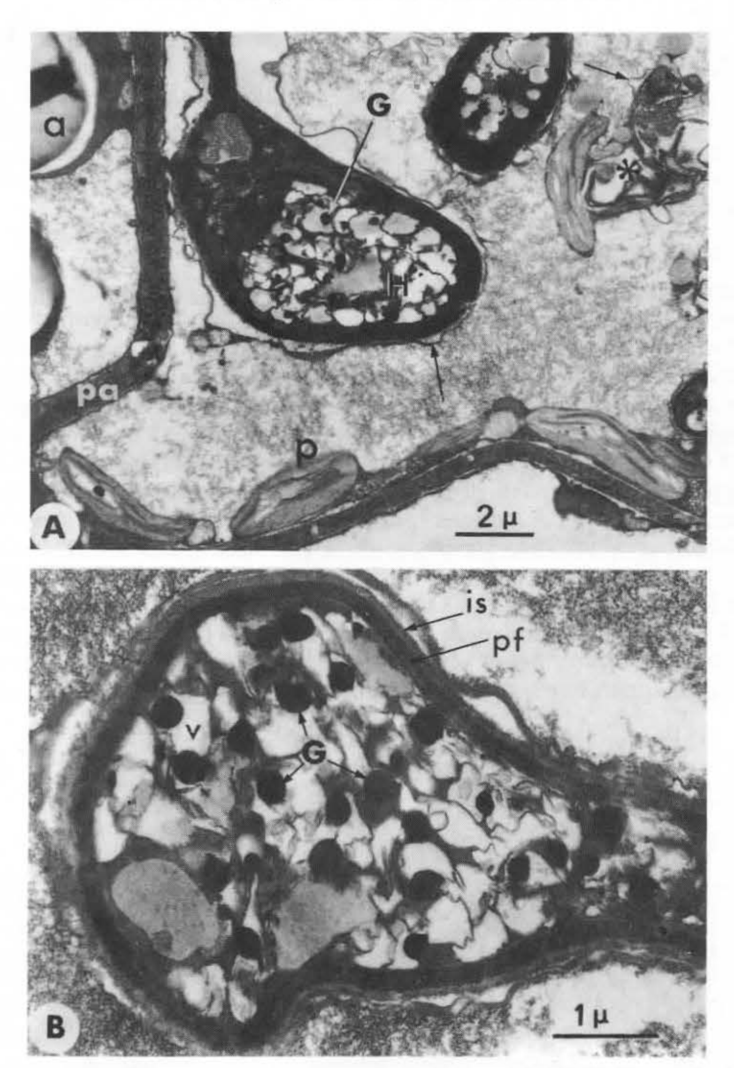


Fig. 3. — Microscopie électronique. Endomycothalle de *Pellia epiphylla*. A. Aspects des hyphes (H) à l'intérieur d'une cellule-hôte. Noter la présence des granules métachromatiques vacuolaires (G). Les filaments et les arbuscules détruits (astérisque) sont entourés par le plasmalemme de la cellule-hôte (flèches). Cette cellule-hôte montre des plastes (p) sans amidon mais pourvus de thylakoïdes et de grana. Les plastes des cellules non infestées possèdent des grains d'amidon volumineux (a). pa, paroi de la cellule-hôte. B. Détails d'une hyphe intracellulaire. L'interface hôte-symbiote est composée de la couche d'isolement (is) et de la paroi fongique (pf). Le Champignon montre de nombreux granules métachromatiques vacuolaires (G) mesurant de 0,1 à 0,4 µm. v, vacuole fongique.

— *Electron microscopy. Endomycothallus of* Pellia epiphylla. *A. Aspects of the hyphae (H) in a host-cell. Note the presence of metachromatic vacuolar granules (G). The filaments and the collapsed arbuscules (asterisk) are surrounded by the host-cell plasmalemma (arrows). This host-cell shows numerous plastids (p) without starch but with thylakoïds and grana. The plastids of non-infected cells have large starch grain (a). pa, host-cell wall. B. Details of an intracellular hypha. The host-symbiot interface contains the encasement layer (is) and the fungal wall (pf). The fungus shows numerous metachromatic vacuolar granules (G) measuring from* 0,1 *to* 0,4 *µm. v, fungal vacuole.*

Endomycothalles du *Pellia epiphylla*

Le Champignon se développe dans le thalle (*fig.* 3 A). Il constitue des arbuscules et des vésicules entourés par la paroi fongique, une couche d'isolement et le plasmalemme de la cellule-hôte. Au cours de la phase de destruction de l'endophyte les filaments s'aplatissent et se regroupent en amas résiduels caractéristiques. Les cellules infestées ont des plastes munis d'empilements granaires mais dépourvus d'amidon. Dans les cellules non infestées, il existe au contraire des plastes à amidon. En raison de la présence d'hyphes nucléées formant des vésicules et des arbuscules intracellulaires, le Champignon symbiotique du *Pellia* a été rattaché aux Endogonacées. Les mycothalles du *Pellia* diffèrent peu des endomycorhizes à vésicules et arbuscules; il convient de les nommer endomycothalles. Néanmoins il faut noter que dans les endomycothalles, le Champignon prolifère dans des cellules pourvues de chloroplastes ce qui, dans l'état actuel des connaissances, n'est jamais le cas pour les endomycorhizes des plantes supérieures.

Dans les hyphes intracellulaires les granules de polyphosphates sont très nombreux (*fig.* 3 B). Leur taille atteint de 0,1 à 0,4 µm. Ils sont appliqués le long du tonoplaste dans des vacuoles qui mesurent généralement de 0,5 à 1 µm. Certaines vacuoles dépassant largement 1 µm ne présentent pas de granules.

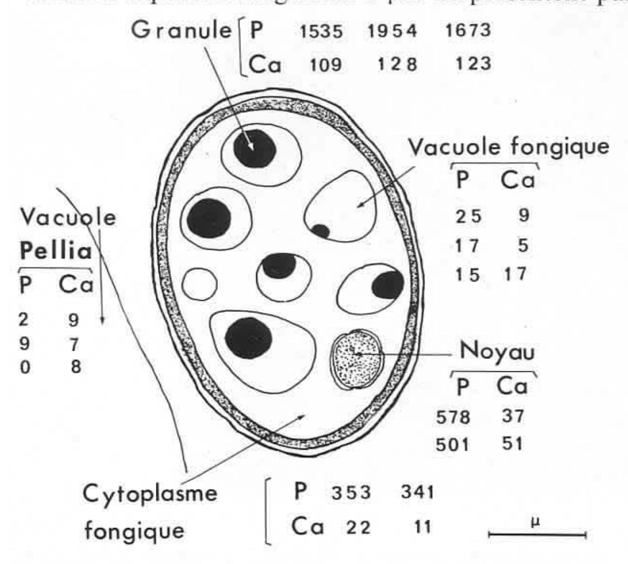


FIG. 4. — Schéma d'une hyphe intracellulaire d'endomycothalle de *Pellia epiphylla* et teneurs relatives en phosphore et en calcium en différents points caractéristiques (coups . sec^{-1} . 10).

— *Schematic representation of an intracellular hypha of a* Pellia epiphylla *endomycothallus showing the relative levels of phosphorus and calcium in some characteristic points* (*counts . sec*$^{-1}$ × 10).

Les résultats de la microanalyse sont présentés dans la figure 4. Celle-ci représente une hyphe endocellulaire entourée par des couches pariétales et le plasmalemme de la cellule-hôte. Les comptages montrent que les granules sont très riches en phosphore; ils contiennent en particulier plus de phosphore que le cytoplasme et les noyaux fongiques. La concentration en calcium des granules apparaît supérieure à celle des vacuoles claires, du cytoplasme et des noyaux fongiques.

La figure 5 A correspondant à une image en électrons secondaires montre une hyphe (H) pourvue de plusieurs granules (g_1, g_2, g_3). La paroi de la cellule-hôte est aussi reconnaissable (pa). La figure 5 B superpose à cette image, l'enregistrement de la concentration en phosphore (P) analysée au cours d'une traversée de la cellule passant par le granule g_1. La figure 5 C représente le cliché correspondant, mettant en évidence le calcium (Ca) présent dans le même granule.

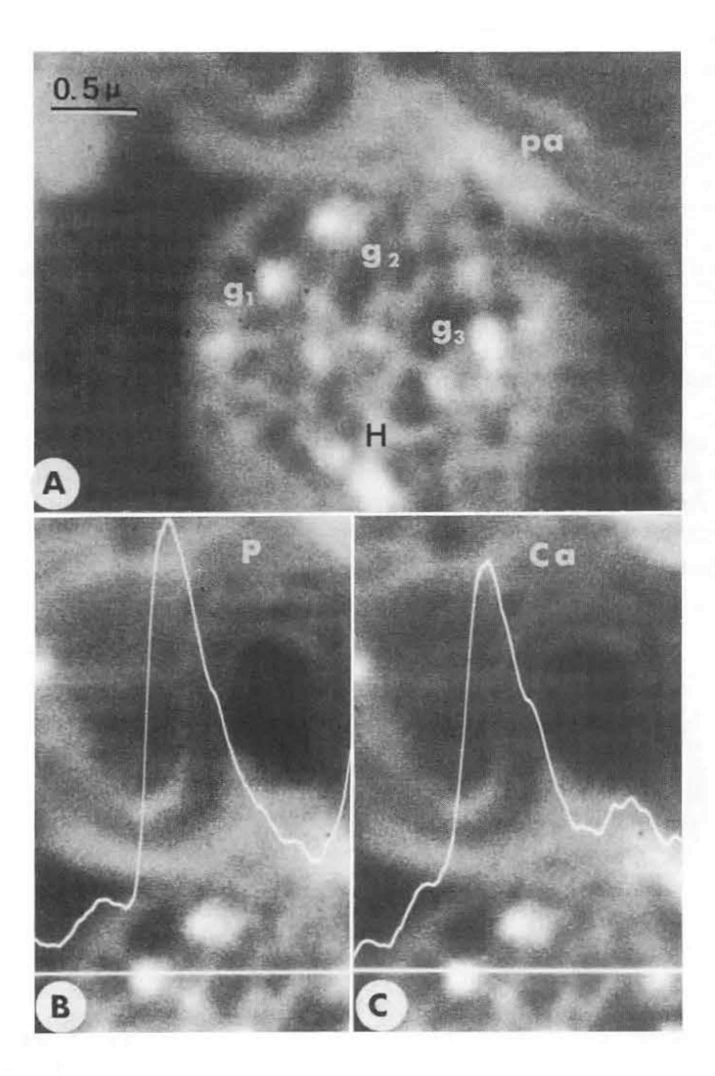


FIG. 5. – Microscopie électronique. Endomycothalle de *Pellia epiphylla*. A. Image en électrons secondaires d'une coupe de 1 300 Å. Une hyphe (H) aux contours arrondis est visible. A l'intérieur de cette hyphe plusieurs granules apparaissent sous la forme de taches claires (g_1, g_2, g_3). Noter aussi la paroi de la cellule du *Pellia* (pa). B. Ce cliché superpose une image en électrons secondaires dans la zone des granules g_1 et g_2, une ligne matérialisant le déplacement du signal et traversant le granule g_1 et la courbe mettant en évidence le phosphore présent au niveau du granule g_1. C. Ce cliché superpose à la même image en électrons secondaires, le déplacement du signal et la courbe montrant l'existence de calcium au niveau du granule g_1.

– *Electron microscopy. Endomycothallus of* Pellia epiphylla. *A. Secondary electron image of a* 1 300 Å *thin section. The rounded hypha (H) shows many granules appearing as light spots* (g_1, g_2, g_3). *Also notice the cell-wall of* Pellia *(pa). B. In this figure, over the secondary-electron image of the* g_1 *and* g_2 *granules, are superimposed a straight line corresponding to the displacement of the signal over the analysed cell and the curve of phosphorus content found in the* g_1 *granule. C. Same technique and same analysed area as in B, but concerning the level of calcium in the* g_1 *granule.*

DISCUSSION

Des granules riches en phosphore et diversement nommés (granules métachromatiques, granules de polyphosphates, grains de volutine) sont connus chez de nombreux microorganismes : Bactéries, Cyanophytes et Champignons (HAROLD, 1966; JENSEN, 1968; BENNETT et SCOTT, 1971; JENSEN et SICKO, 1974; GEZELIUS, 1974; JONES et CHAMBERS, 1975; SICKO-GOAD *et al.*, 1975; WOOL et HELD, 1976; GOURRET, 1978; DOONAN *et al.*, 1979). Outre le phosphore, régulièrement détecté par microanalyse dans ces granules, les auteurs mentionnent différents cations. Ainsi, le calcium est présent dans tous les cas analysés chez des Champignons formant des mycorhizes. Toutefois, le nombre d'analyses détaillées, réalisées par microanalyse en cytologie fine demeure encore limité (WHITE et BROWN, 1979; STRULLU *et al.*, 1981). Chez d'autres microorganismes, il apparaît que la présence du calcium est variable. SICKO-GOAD *et al.*, (1975) signalent la présence de phosphore et de calcium dans les polyphosphates de *Plectonema boryanum*. COLEMAN *et al.* (1972) notent chez *Tetrahymena pyriformis* deux catégories de granules, l'une riche en phosphore et calcium, l'autre en phosphore et magnésium. WOOL et HELD (1976) ont montré que seules les zoospores enkystées à parois épaisses de *Rozella allomycis* contiennent à la fois du phosphore et du calcium, les cystes à parois minces ont des polyphosphates dépourvus de calcium. DOONAN *et al.* (1979) n'ont pas trouvé de calcium dans les granules d'*Aureobasidium pullulans*. Les méthodes de microanalyse ne permettent pas de détecter des éléments dont le nombre atomique est inférieur à 11. Il est admis que l'oxygène et l'hydrogène sont présents (DOONAN *et al.*, 1979).

Dans les mycorhizes le phosphore, le calcium, le fer, le chlore, le soufre, le molybdène et le potassium ont été détectés par WHITE et BROWN (1979) chez le *Glomus mosseae* associé au Soja. Le phosphore a été analysé par COX *et al.* (1980) chez le même Champignon associé à l'Oignon. Le phosphore, le calcium, le potassium et le magnésium ont été trouvés (STRULLU *et al.*, 1981) chez l'endophyte de *Taxus baccata* grâce à des mesures en dispersion de longueur d'onde; des mesures en dispersion d'énergie ont en outre permis de déceler la présence du chlore (STRULLU, GOURRET et GARREC, non publié).

Les analyses des granules vacuolaires des Champignons formant des mycorhizes ont toutes été faites à partir de matériel préalablement fixé. Cette fixation est nécessaire pour atteindre un haut niveau de résolution adapté aux faibles dimensions des organites ou compartiments cellulaires étudiés (granules, vacuoles, noyaux, etc.). WHITE et BROWN (1979) ont montré que le tampon cacodylate donne une meilleure conservation du matériel que le tampon phosphate. La nature du fixateur et la concentration du tampon ont peu d'influence. COX *et al.* (1980) ont estimé à 3.10^{-14} g.μm^{-3} en moyenne la concentration en phosphore des plus gros granules de *Glomus mosseae*. La quantité de calcium contenue dans les granules métachromatiques des Champignons formant des mycorhizes n'a pas encore été calculée. Des expériences ultérieures devraient cependant permettre de réaliser, au niveau des organites cellulaires, des analyses à la microsonde électronique à partir de matériel non fixé, soit séché à l'air, soit déshydraté par des techniques de cryo-substitution (GAY et GARREC, 1980; BÄRTSCHI et GARREC, 1980).

Nos résultats démontrent que les ectomycorhizes et les endomycorhizes bien que très différentes d'un point de vue morphologique, anatomique ou cytologique ont un caractère commun : la présence de granules vacuolaires dont la teneur en phosphore et en calcium est particulièrement élevée. Selon toute vraisemblance, le phosphore mis en évidence est engagé dans des structures linéaires polycondensées formées de

phosphates inorganiques liés par des fonctions anhydrides phosphoriques, identiques à celles riches en énergie de l'ATP.

Les polymères ont la composition suivante : $M_{n+2} P_n O_{3n+1}$ (CALLOW *et al.*, 1978). Ces polyphosphates, qui expliquent la métachromasie des granules, sont des polyanions non diffusibles et fortement chargés. Pour que soit maintenu l'équilibre ionique du compartiment vacuolaire, ils doivent être neutralisés par des cations (MATILE, 1978). Dans les trois cas étudiés (mycorhizes et mycothalle) un tel rôle pourrait être attribué à l'ion Ca^{++}. Ce rôle a déjà été proposé chez des Bactéries (WIDRA, 1959) et des Cyanobactéries (SICKO-GOAD *et al.*, 1975). Cependant les comptages que nous avons effectués à la microsonde sur des cristaux de phosphate tricalcique montrent que le nombre de coups correspondant au calcium y est environ 6 fois supérieur au nombre de coups du phosphore. Comme dans les granules le nombre de coups du calcium est souvent équivalent ou très inférieur à ceux qui sont imputables au phosphore (cas du *Pellia*), la possibilité d'intervention d'autres cations minéraux ou organiques doit être considérée.

Le potassium est impliqué dans la stabilisation des polyphosphates d'*Anabaena cylindrica* et d'*Oscillatoria burneti* (FUHS, 1969) et dans ceux de *Chlorella pyrenoidosa* (PEVERLY *et al.*, 1978). En outre, la présence de potassium est nécessaire pour la synthèse des polyphosphates chez la Chlorelle; l'absence de cet élément dans le milieu limite l'accumulation du phosphore et la formation des polyphosphates, alors que l'absence de calcium ou de magnésium n'a pas d'effet. Les granules de polyphosphates de l'endophyte du *Taxus* contiennent du potassium, en plus du calcium et du magnésium (STRULLU *et al.*, 1981). Le potassium interviendrait également dans la synthèse des granules de polyphosphates des mycorhizes.

Le cation organique pour lequel une fonction dans la neutralisation des polyphosphates a été proposée est l'arginine. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, cet acide aminé est séquestré dans la vacuole sous forme de complexes avec les polyphosphates (DURR *et al.*, 1979; WIEMKEN *et al.*, 1979). D'essais préliminaires réalisés sur les mycorhizes de *Taxus baccata*, il apparaît que ces structures ont des teneurs relatives en glutamine particulièrement élevées (STRULLU et LARHER, résultats non publiés). Une situation identique a déjà été signalée dans des mycorhizes de Hêtre (HARLEY, 1964; CARRODUS, 1966, 1967), également pourvues de polyphosphates (CHILVERS et HARLEY, 1980). La glutamine pourrait, elle aussi participer, au moins de façon transitoire, à la neutralisation des polyphosphates. Nous nous proposons de préciser, par l'analyse minérale et organique des granules de polyphosphates isolés de mycorhizes, la nature et l'importance quantitative des divers cations minéraux ou organiques engagés dans la stabilisation des polymères intravacuolaires.

Remerciements

Nous remercions M. François LARHER (Université de Nancy) pour l'aide apportée à la mise au point de la discussion. Nous remercions aussi tout particulièrement M. Jean-Pierre BOSSY (C.N.R.S.) pour son assistance technique auprès de la microsonde Camebax.

BIBLIOGRAPHIE

ASHFORD A. E., LING LEE M. et CHILVERS G. A., 1975. — Polyphosphate in eucalypt mycorrhizas : a cytochemical demonstration. *New Phytol.*, **74**, 447-453.

BÄRTSCHI H. et GARREC J. P., 1980. — Étude comparative de la répartition cytologique de quelques éléments dans l'écorce de racines saines et d'endomycorhizes de *Vitis vinifera* L., *C. R. Acad. Sc.*, Paris, **290**, série D, 919-922.

BENNET J. et SCOTT K. J., 1971. — Inorganic polyphosphates in the wheat stem rust fungus and in rust-infected wheat leaves. *Physiol. Plant Pathol.*, **1**, 185-198.

BOULLARD B., 1968. — *Les mycorhizes. Monographie Bot. et Biol. vég.*, Masson, Paris.

BOWEN G. D., 1973. — Mineral nutrition of Ectomycorrhizas. In *ectomycorrhizae*. G. C. MARKS et T. T. KOZLOWSKY, éd., Academic Press, New York, Londres, 151-205.

BOWEN G. D., BEVEGE D. I. et MOSSE B., 1975. — Phosphate physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizas. In *Endomycorrhizas*. F. E. SANDERS, B. MOSSE et P. B. TINKER, éd., Academic Press, New York, Londres, 241-260.

CALLOW J. A., CAPACCIO L. C. M., PARISH G. et TINKER P. B., 1978. — Detection and estimation of polyphosphate in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.*, **80**, 125-134.

CARRODUS B. B., 1966. — Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. I. Factors affecting the assimilation of nitrogen. *New. Phytol.*, **65**, 358-371.

CARRODUS B. B., 1967. — Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. II. Ammonium and nitrate as sources of nitrogen. *New. Phytol.*, **65**, 1-4.

CHILVERS G. A. et HARLEY J. L., 1980. — Visualisation of phosphate accumulation in beech mycorrhizas. *New. Phytol.*, **84**, 319-326.

COLEMAN J. R., NILSSON J. R., WARNER R. R. et BATT P., 1972. — Qualitative and quantitative electron probe analysis of cytoplasmic granules in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, **74**, 207-219.

COX G., MORAN K. J., SANDERS F., NOCKOLDS C. et TINKER P. B., 1980. — Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New. Phytol.*, **84**, 649-659.

COX G., SANDERS F. E., TINKER P. B. et WILD J. A., 1975. — Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In *Endomycorrhizas*. F. E. SANDERS, B. MOSSE et P. B. TINKER, éd., Academic Press, New York et Londres, 297-312.

DESPORTES A., CHAMEL A., FOURCY A., GARREC J. P., LHOSTE A. M. et PLEBIN R., 1978. — Mise en évidence de l'action du fluor sur la teneur en calcium des chloroplastes du mésophylle de *Zea mays* par analyse directe à la microsonde électronique. *Biol. Cell.*, **37**, 197-200.

DOONAN B. B., GRANG R. E., JENSEN T. E. et BAXTER M., 1979. — *In situ* X-ray energy dispersive microanalysis of polyphosphate bodies in *Aureobasidium pullulans*. *J. Ultrastructure Res.*, **69**, 232-238.

DÜRR M., URECH K., BOLLER T., WIEMKEN A., SCHWENCKE J. et NACY M., 1979. — Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Arch. Mikrobiol., **121**, 169-175.

EBEL J. P., COLAS J. et MULLER S., 1958. — Recherches cytochimiques sur les phosphates inorganiques contenus dans les organismes vivants. II. Mise au point de méthodes de détection cytochimiques spécifiques des polyphosphates. *Exp. Cell. Res.*, **15**, 28-36.

FUHS G. W., 1969. — Interferenzmikroskopische Beobachtungen an den Polyphosphatkörpern und Gasvakuoles von Cyanophyceen. *Osterr. Bot. Z.*, **116**, 411-422.

GAY G. et GARREC J. P., 1980. — Premiers essais de microlocalisation de quelques éléments minéraux dans les racines courtes et les mycorhizes de *Pinus halepensis* Mill. *C. R. Acad. Sc.*, Paris, **290**, série D, 69-71.

GEZELIUS K., 1974. — Inorganic polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Mikrobiol.*, **98**, 311-329.

GOURRET J. P., 1978. — Description et interprétation des nucléoïdes structurés observés dans des bactéroïdes de *Rhizobium*. *Biol. Cell.*, **32**, 299-306.

HAROLD F. M., 1966. — Inorganic polyphosphates in biology : structure, metabolism and function. *Bacteriol. Rev.*, **30**, 772-794.

HARLEY J. L., 1964. — Incorporation of carbon dioxide into excised beech mycorrhizas in the presence and absence of ammonia. *New. Phytol.*, **63**, 203-208.

HARLEY J. L., 1969. — *The Biology of Mycorrhiza*. Lenonard Hill, Londres.

HARLEY J. L., 1978. — Nutrient absorption by ectomycorrhizas. *Physiol. vég.*, **16**, 533-545.

JENSEN T. E., 1968. — Electron microscopy of polyphosphate bodies in a blue-green alga, *Nostoc pruniforme*. *Arch. Mikrobiol.*, **62**, 144-152.

JENSEN T. E. et SICKO L. M., 1974. — Phosphate metabolism in the blue-green algae. I. Fine structure of the "polyphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum*. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1232-1239.

JONES H. E. et CHAMBERS L. A., 1975. — Localized intracellular polyphosphate formation by *Desulfovibrio gigas*. *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 67-72.

LING LEE M., CHILVERS G. A. et ASHFORD A. E., 1975. — Polyphosphate granules in three different kinds of tree mycorrhiza. *New. Phytol.*, **75**, 551-555.

MAGROU J., 1925. — La symbiose chez les hépatiques. Le *Pellia epiphylla* et son champignon commensal. *Ann. Sc. Nat., Bot.*, 10e sér., **7**, 725-779.

MATILE P., 1978. — Biochemistry and function of vacuoles. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **29**, 193-213.

PARIS N., CHAMEL A., CHEVALIER S., FOURCY A., GARREC J. P. et LHOSTE A. M., 1978. — Application de quelques techniques nouvelles à l'étude de la microlocalisation des ions dans les tissus végétaux. *Physiol. vég.*, **16**, 17-35.

PEVERLY J. H., ADAMEC J. et PARTHASARATHY M. V., 1978. — Association of potassium and some other monovalent cations with occurrence of polyphosphate bodies in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant. Physiol.*, **62**, 120-126.

PEYRONEL B., FASSI B., FONTANA A. et TRAPPE J. M., 1969. — Terminology of mycorrhizae. *Mycologia*, **61**, 410-411.

SICKO-GOAD L. M., GRANG R. E. et JENSEN T. E., 1975. — Phosphate metabolism in blue-green algae. IV. *In situ* analysis of polyphosphate bodies by X-ray energy dispersive analysis. *Cytobiologie*, **11**, 430-437.

STRULLU D. G., 1976. — Recherches de biologie et de microbiologie forestières. Étude des relations nutrition-développement et cytologie des mycorhizes chez le Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirb.) et les Abiétacées. *Thèse Doct. Etat*, Université de Rennes.

STRULLU D. G., 1978. — Histologie et cytologie des endomycorhizes. *Physiol. vég.*, **16**, 657-669.

STRULLU D. G. et GOURRET J. P., 1973. — Étude des mycorrhizes ectotrophes de *Pinus brutia* Ten en microscopie électronique à balayage et à transmission. *C. R. Acad. Sc.*, Paris, **227**, série D, 1757-1760.

STRULLU D. G. et GOURRET J. P., 1980. — Données ultrastructurales sur l'intégration cellulaire de quelques parasites ou symbiotes de plantes. II. Champignons mycorhiziens. *Bull. Soc. bot. Fr.*, **127**, 97-106.

STRULLU D. G., GOURRET J. P., GARREC J. P. et FOURCY A., 1981. — Ultrastructure and electron-probe microanalysis of the metachromatic vacuolar granules occuring in *Taxus* mycorrhizas. *New. Phytol.*, **87** (in press).

THIBAUT M., ANSEL M. et DE AZEVEDO CARNERO J., 1977. — X-ray microanalysis as applied to fungal tissues. *Br. J. exp. Pathol.*, **58**, 209-214.

TINKER P. B., 1978. — Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. *Physiol. vég.*, **16**, 743-751.

WIDRA A., 1959. — Metachromatic granules in microorganisms. *J. Bacteriol.*, **78**, 664-760.

WHITE J. A. et BROWN M. F., 1979. — Ultrastructure and X-ray analysis of phosphorus granules in a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Can. J. Bot.*, **57**, 2812-2818.

WIEMKEN A., SCHELLENBERG M. et URECH K., 1979. — Vacuoles : the sole compartments of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Mikrobiol.*, **123**, 23-35.

WOOL S. H. et HELD A. A., 1976. — Polyphosphate granules in encysted zoospores of *Rozella allomycis*. *Arch. Mikrobiol.*, **108**, 145-148.